

# 固相萃取高效液相色谱-串联质谱联用法测定蔬菜及其制品中苯甲酰脲类农药残留的不确定度评估

张岩岩\*, 尚岩岩, 赵 杰, 王桂苓  
(阜阳市产品质量监督检验所, 阜阳 236000)

**摘要:** **目的** 对蔬菜及其制品中苯甲酰脲类农药残留的不确定度进行评定。**方法** 通过高效液相色谱-串联质谱联用法对蔬菜及其制品中苯甲酰脲类农药残留量测定过程进行分析, 对数学模型中的各不确定度分量进行识别和量化, 最后计算出相对合成标准不确定度和扩展不确定度。**结果** 当蔬菜及其制品中除虫脲、灭幼脲和氯吡脲的浓度为 10.4、9.98、9.74  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时, 其扩展相对不确定度分别为 3.5%、1.8%和 2.2% ( $k=2$ )。测量不确定度来源主要由标准溶液的配制的准确度、方法的准确度和测量的重复性组成。**结论** 该评估模型为高效液相色谱-串联质谱联用法对蔬菜及其制品中苯甲酰脲类农药残留量的不确定度提供了参考依据。

**关键词:** 不确定度; 高效液相色谱-串联质谱联用法; 苯甲酰脲类; 农药残留

## Uncertainty evaluation of benzoylurea pesticide residues in vegetables and vegetable products determined by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Yan-Yan\*, SHANG Yan-Yan, ZHAO Jie, WANG Gui-Ling  
(Fuyang Product Quality Supervision and Inspection Institute, Fuyang 236000, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a mathematical model of uncertainty evaluation of benzoylurea pesticide residues in vegetables and vegetable products. **Methods** The evaluation process of benzoylurea pesticide residues in vegetables and in vegetable products determined by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), mathematical model was applied to calculate the uncertainty component in the process, then the relative combined standard uncertainty and expanded uncertainty were calculated. **Results** When the content of diflubenzuron, chlorbenzuron and forchlorfenuron in vegetable and vegetable products were 10.4, 9.98 and 9.74  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , the extension relative uncertainty were 3.5%, 1.8% and 2.2% ( $k=2$ ), respectively. The main sources of the uncertainty measurement were the accuracy of standard solution preparation, accuracy of method and the repeatability of measurement. **Conclusion** It provided a reference basis for uncertainty evaluation of benzoylurea pesticide residues in vegetables and vegetable products by HPLC-MS/MS.

**KEY WORDS:** uncertainty; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; benzoylurea; pesticide residues

\*通讯作者: 张岩岩, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 475829091@qq.com

\*Corresponding author: ZHANG Yan-Yan, Engineer, Fuyang Product Quality Supervision and Inspection Institute, No.2008, Huaihe Road, Yingzhou District, Fuyang 236000, China. E-mail: 475829091@qq.com

## 1 引言

苯甲酰胺类农药残留主要有除虫脲、灭幼脲、氯吡脲、氟苯脲、氟虫脲等。目前, 苯甲酰胺类农药残留的检测方法主要是气相色谱法<sup>[1-3]</sup>、液相色谱法<sup>[4-8]</sup>、气相色谱-质谱联用法、液相色谱-串联质谱联用法<sup>[9]</sup>等。由于目前没有标准测定蔬菜及其制品中多种苯甲酰胺类农药残留, 本文主要参考相关标准<sup>[10,11]</sup>对蔬菜及其制品中除虫脲、灭幼脲、氯吡脲测定的不确定度进行分析和评估<sup>[12]</sup>。找出影响蔬菜及其制品中除虫脲、灭幼脲、氯吡脲检测结果的主要因素, 以便在有利于广大分析工作者对使用液相色谱-串联质谱联用法检测蔬菜及其制品中除虫脲、灭幼脲、氯吡脲的过程进行严格控制。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

高效液相色谱仪(1260, 美国 Agilent 公司), 三重四极杆质谱仪配电喷雾离子源(6430, 美国 Agilent 公司), 离心机(TD16-WS, 湖南赛特湘仪离心机有限公司), 超声波提取仪(JK-3200DB, 合肥金尼克机械制造有限公司), 氮吹仪(美国 Organomation 公司)。

除虫脲、灭幼脲、氯吡脲(forchlorfenuron)标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司), 用甲醇配成 1 mg/mL 的标准储备液, 并根据需要稀释成适当浓度的标准工作液, 4 °C 下保存。乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 水为屈臣氏超纯水。

### 2.2 样品前处理

准确称取样品 5.0 g 于 50 mL 具螺旋盖聚丙烯离心管中, 准确加入 20 mL 乙腈涡旋振荡 1 min 后, 加入 3 g NaCl 后振荡混匀 1 min, 超声提取 30 min, 5000 r/min 离心 10 min, 准确移取 10 mL 上层有机相转移至旋蒸瓶中。于 45 °C 下旋转浓缩至近干, 用二氯甲烷溶解后过氨基小柱, 使用 10 mL 二氯甲烷淋洗后, 10 mL 甲醇洗脱; 收集洗脱液用氮吹至干后, 移取 1 mL 甲醇水(1:1, V:V)溶液溶解定容<sup>[13]</sup>, 过 0.22 μm 滤膜, 待上机分析。

### 2.3 数学模型

样品中苯甲酰胺类农药残留含量测量结果可以表示为:

$$X = \frac{C \times V \times 1000}{m \times 1000} \quad (1)$$

式中:

$X$ —试样中苯甲酰胺类农药残留的含量, μg/kg;

$C$ —由标准曲线求得进样液中苯甲酰胺类农药残留的浓度, ng/mL;

$V$ —试样定容体积, mL;

$m$ —样品的质量, g。

## 3 结果与分析

### 3.1 标准溶液的配制与测定

配制除虫脲、灭幼脲、氯吡脲标准浓度为 5.0、10.0、20.0、25.0、40.0、80.0、200.0 ng/mL, 上机进行分析测试, 7 个标准溶液分别测量 3 次<sup>[14,15]</sup>, 结果见表 1。

表 1 标准溶液系列测定结果  
Table 1 The standard curve results

标准溶液浓度, ng/mL	除虫脲峰面积 $A_{i1}$			灭幼脲峰面积 $A_{i2}$			氯吡脲峰面积 $A_{i3}$		
5.0	515	492	435	658	650	670	335	368	370
10.0	888	807	799	1150	1165	1140	685	672	690
20.0	1508	1436	1418	2039	2033	2050	1206	1198	1212
25.0	3341	3243	3297	4689	4689	4700	2899	2916	2913
40.0	7015	6985	6995	8216	8309	8298	5400	5468	5486
80.0	10001	9797	9856	12569	12600	12596	7821	7856	7889
200.0	13105	12986	13049	15789	15643	15688	9899	9910	9926

### 3.2 线性方程

根据表1数据作标准工作曲线,其线性方程为:

除虫脲:  $Y = 648.375183X - 185.90215$ , 相关系数  $r = 0.9989$ ;  $b = 648.375183$ ;  $a = -185.90215$ 。

灭幼脲:  $Y = 768.83751X - 105.51185$ , 相关系数  $r = 0.9999$ ;  $b = 768.83751$ ;  $a = -105.51185$ 。

氯吡脲:  $Y = 748.375183X + 165.85115$ , 相关系数  $r = 0.9998$ ;  $b = 748.375183$ ;  $a = 165.85115$ 。

### 3.3 测量结果的不确定度评定

从实验方法和数学模型可以看出,检验由标准液制备、样品制备、仪器测定等几部分组成。因此,测量不确定度的主要来源有:(1)苯甲酰脲类标准溶液校正引入的不确定度;(2)苯甲酰脲类标准品纯度及样品称量引入的不确定度;(3)定容配制测量液、进样引入的测量不确定度;(4)整个实验重复性测量引入的不确定度。

#### 3.3.1 拟合标准工作曲线求值引入的不确定度

以标准溶液浓度  $X$  为横坐标,标准品峰面积  $Y$  为纵坐标。绘制标准工作曲线。根据表1数据,标准工作曲线中,残余标准差  $S$  和标准工作曲线中自变量偏差平方和  $S_{xx}$  分别为:

$$S = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n [A_{ji} - (a + bC_i)]^2}}{m \times n - 2};$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2.$$

测量样品溶液6次,即  $P=6$ ,根据表2数据,样品溶液由于拟合标准工作曲线求值引入的不确定度:

$$u_R(x_0) = \frac{S}{b} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n \times m} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}}};$$

除虫脲相对标准不确定度  $u_{R,rel1} = 0.0376$ ;

灭幼脲相对标准不确定度  $u_{R,rel2} = 0.0306$ ;

氯吡脲相对标准不确定度  $u_{R,rel3} = 0.0247$ 。

#### 3.3.2 标准液浓度引入的测量不确定度

配制标准校正液时,标准品称量、定容等过程将引入不确定度。但是使用线性最小二乘法拟合曲线的前提是假定横坐标的量的不确定度远小于纵坐标的量的不确定度,通常的B不确定度评定仅仅与标准溶液的峰面积有关,而与标准液不确定度无关,也不与从同一溶液中逐次稀释产生必然的相关性,因此,

标准校正液浓度引入的测量不确定度可以忽略不计。

#### 3.3.3 标准品纯度及样品称量引入的不确定度

(1)根据标准物质证书,除虫脲、灭幼脲、氯吡脲标样的纯度分别为95.6%、98.5%、98.7%,纯度偏差分别为 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.6\%$ 、 $\pm 0.5\%$ ,按照正态分布估算,取包含因子为2,则标样的相对标准不确定度  $u_{n,rel1}$ 、 $u_{n,rel2}$ 、 $u_{n,rel3}$  分别为0.25%、0.30%、0.25%。

(2)电子天平经检定合格,根据其检定证书和产品附机参数,电子天平的线性和重复性分别为 $\pm 0.01$  mg,计算标准不确定度时假设其是矩形分布。实际测量时称量样品约0.1 g,由于使用电子天平去皮测量,去皮前后两次测量结果强相关,称量样品质量时带来标准不确定度  $u_m$  为  $2 \cdot \sqrt{(0.1^2 + 0.1^2)}/3$  mg,即0.164 mg。其相对标准不确定度  $u_{m,rel1}$ 、 $u_{m,rel2}$ 、 $u_{m,rel3}$  均为0.16%。

#### 3.3.4 实际测量时,样品配制测量引入的测量不确定度

##### (1)样品称量引入的不确定度

电子天平经检定合格,根据其检定证书和产品附机参数,电子天平的线性和重复性分别为 $\pm 0.1$  mg,计算标准不确定度时假设其是矩形分布。实际测量时称量样品约5.0 g,由于使用电子天平去皮测量,去皮前后两次测量结果强相关,称量样品质量时带来标准不确定度  $u_m$  为  $2 \cdot \sqrt{(0.1^2 + 0.1^2)}/3$  mg,即0.164 mg。其相对标准不确定度  $u_{m2,rel1}$ 、 $u_{m2,rel2}$ 、 $u_{m2,rel3}$  均为0.04%。

##### (2)样品定容体积引入的不确定度

本次实验使用刻度移液管定容1 mL,根据标准<sup>[16]</sup>规定,1 mL的移液管的相对允许误差为0.8%,按照矩形分布,计算定容体积引入的不确定度为: $u_{v1}$ 、 $u_{v2}$ 、 $u_{v3}$  均为0.0046%。

实验室温度在 $\pm 5$  °C之间变化,水温的膨胀系数为  $\Delta t = 2.1 \times 10^{-4}$  °C,属于B类不确定度,假设为矩形分布,引入的不确定度为: $u_t1$ 、 $u_t2$ 、 $u_t3$  均为0.061%。

因此样品体积引起的不确定度  $u_{V,rel} = \sqrt{u_v^2 + u_t^2}$  得到: $u_{V,rel1}$ 、 $u_{V,rel2}$ 、 $u_{V,rel3}$  均为0.084%。

### 3.4 实验重复性测量引入的不确定度

按2.2方法,取黄瓜试样,重复性条件下测定样品6次,按照公式(1)计算其含量,样品测定结果见表2。

表 2 样品重复性测定结果  
Table 2 Results of sample repeatability

	样品中除虫 脞浓度( $C_i$ ), μg/kg	样品中灭幼 脞浓度( $C_i$ ), μg/kg	样品中氯 吡脞浓度( $C_i$ ), μg/kg
1	10.2	10.1	9.95
2	10.4	9.68	9.78
3	10.4	9.80	9.80
4	10.5	9.92	9.74
5	10.6	9.78	9.65
6	9.90	9.85	9.52
平均值	10.3	9.86	9.74
相对标准差	2.43	1.46	1.49

重复性测量引入的不确定度采用 A 类评定。表 2 数据, 格拉布斯检验 0.95 置信水平下无粗大异常值。根据贝赛尔公式, 计算出 6 次测量的标准差的相对值

$$\text{为: } s(\bar{q}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^6 (c_i - \bar{c})^2}{6-1}} / \bar{c}$$

实测时以双试验平均值表示测量结果时, 测量结果的 A 类相对标准不确定度:

$$\text{除虫脞 } u_{c,rel}1 = s(\bar{q})/\sqrt{2} = 1.72\%;$$

$$\text{灭幼脞 } u_{c,rel}2 = s(\bar{q})/\sqrt{2} = 0.86\%;$$

$$\text{氯吡脞 } u_{c,rel}3 = s(\bar{q})/\sqrt{2} = 1.06\%。$$

### 3.5 相对合成标准不确定度和相对扩展不确定度

根据以上评估过程, 将不确定度的 A 类评定结果和各分量评估结果合成, 得出相对合成标准不确定度:

$$u_{rel}^2 = u_{R,rel}^2 + u_{n,rel}^2 + u_{m,rel}^2 + u_{m2,rel}^2 + u_{V,rel}^2 + u_{c,rel}^2$$

以任意两次测量结果平均值为检测结果(如第 1 次测量和第 5 次测量), 除虫脞  $\bar{X}_1=10.4 \mu\text{g/kg}$ , 灭幼脞  $\bar{X}_2=9.98 \mu\text{g/kg}$ , 氯吡脞  $\bar{X}_3=9.74 \mu\text{g/kg}$  取包含因子  $k=2$ , 则苯甲酰胺类农药残留含量的测量结果及其相对扩展不确定度可表征为:

$$\text{除虫脞: } \bar{X}_1=10.4 \mu\text{g/kg}, U_{rel}=3.5\%, k=2.$$

$$\text{灭幼脞: } \bar{X}_2=9.98 \mu\text{g/kg}, U_{rel}=1.8\%, k=2.$$

$$\text{氯吡脞: } \bar{X}_3=9.74 \mu\text{g/kg}, U_{rel}=2.2\%, k=2.$$

## 4 结果与讨论

该研究通过固相萃取液相色谱-串联质谱联用法对蔬菜及其制品中多种苯甲酰胺类农药残留的不确定度评定, 可以看出, 以上的评定过程中各分量影响最大的因素是测量的重复性, 其次是标准品的准确度等。但是, 总整体来看, 以上各分量对结果的影响均偏小, 可能原因是对不确定因素考虑不周全, 例如, 样品的制备的均一性就没有考虑在内。还有重复性评价过于简单和笼统, 在重复性评价中, 重复性应该考虑整个分析方法, 细化到每一个环节包括前处理的重复性, 色谱和质谱的重复性和稳定性等。因此, 在以后的检测中注意对不确定度影响分量的识别, 科学评价每一个不确定度分量, 加强这些方面的质量控制, 规范操作有效减少不确定度, 从而保证测量结果的准确和可靠。

### 参考文献

- [1] 殷朝珍, 翟付凤, 董卫峰. 气相色谱法测定蔬菜中有机磷农药残留量不确定度评定研究[J]. 现代农业科技, 2014,(17): 153-155.  
Yin CZ, Zhai FF, Dong WF. Uncertainty evaluation of organic phosphorus pesticide residues in vegetables determined by GC [J]. Mod Agric Sci Technol, 2014, (17): 153-155.
- [2] 林冬云. 气相色谱法测定蔬菜中甲胺磷农药残留量的测量不确定度评定[J]. 福建轻纺, 2006, (9): 50-53.  
Lin DY. Uncertainty evaluation of methamidophos pesticide residues in vegetables determined by GC [J]. Fujian Light Textile, 2006, (9): 50-53.
- [3] 黄荣浪, 章虎, 王祥云, 等. 气相色谱法测定蔬菜中有机磷农药残留的测量不确定度[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(13): 7124-7127.  
Huang RL, Zhang H, Wang XY, et al. Measure uncertainty of measuring organic phosphorus pesticide residues in vegetables with GC [J]. Anhui Agric Sci, 2010, 38(13): 7124-7127.
- [4] Liu Q, Gong DX, Peng XC, et al. Determination of forchlorfenuron dissipation and residue in cucumbers and red soil [J]. J Northeast Agric Univ, 2010, 17(1): 27-31.
- [5] 侯玉茹, 杨媛, 石磊, 等. 固相萃取-高效液相色谱法检测葡萄中氯吡脞的研究[J]. 食品科技, 2011, 36: 255-258.  
Hou YR, Yang Y, Shi L, et al. Study of determination of forchlorfenuron grape by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. Food Sci Technol, 2011, 36: 255-258.
- [6] 李瑞娟, 于建垒, 宋国春, 等. 氯吡脞在猕猴桃和土中的消解动态与残留测定[J]. 山东农业科学, 2009, 2: 78-80, 83.

- Li RJ, Yu JL, Song GC, *et al.* Degradation dynamic and residue determination of forchlorfenuron in Chinese gooseberry fruit and soil [J]. *Shandong Agric Sci*, 2009, 2: 78–80, 83.
- [7] Chen CL, Li JZ, Wu HL. Residue analysis on forchlorfenuron in watermelon soil field [J]. *Environ Chem*, 2006, 25: 789–792.
- [8] Ji YH, Jian ZL. Determination of forchlorfenuron residues in watermelon by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. *AOAC Int*, 2006, 89 (6): 1635–1639.
- [9] 郑玲, 李丽华, 黄大新, 等. 液相色谱-串联质谱法对水果中氯吡脞残留的测定[J]. *食品工业*, 2011, 7: 90–92.
- Zheng L, Li LH, Huang DX, *et al.* Determination of forchlorfenuron fruits by liquid chromatography-electrospray negative ionization mass spectrometry [J]. *Food Ind*, 2011, 7: 90–92.
- [10] SN/T3643-2013 出口水果中氯吡脞(比效隆)残留量的检测方法 液相色谱-串联质谱法 [S]
- SN/T3643-2013 Determination of forchlorfenuron residue in fruits for export LC-MS-MS method. [S]
- [11] JJF1059-1999 测量不确定度评定与表示 [S]
- JJF1059-1999 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S]
- [12] 张燕, 舒平, 狄家卫, 等. 分散固相萃取-液相色谱-串联质谱联用法测定水果中氯吡脞的不确定度评定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(10): 4212–4217.
- Zhang Y, Shu P, Di JW, *et al.* Uncertainty evaluation of forchlorfenuron in fruits by florisil dispersive solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(10): 4212–4217
- [13] 罗伟强, 肖小华, 李攻科, 等. 蔬果中氯吡脞残留样品前处理及分析方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(4): 1090–1092.
- Luo WQ, Xiao XH, Li GK, *et al.* Progress in sample preparation and analysis of forchlorfenuron in vegetables and fruits [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(4): 1090–1092.
- [14] 洪武兴, 罗聪亮, 刘益锋, 等. 液质联用法罗非鱼中磺胺嘧啶不确定度的评定[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(11): 1369–1372.
- Hong WX, Luo CL, Liu YF, *et al.* Evaluation of uncertainty for detection of sulfadiazine residue in tilapia by HPLC-MS-MS [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2009, 25(11): 1369–1372.
- [15] 张厚森, 武晓静, 王玮, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定猪肉中磺胺多辛的不确定度评定[J]. *食品工程*, 2012, 3: 55–58.
- Zhang HS, Wu XJ, Wang W, *et al.* Evaluation of the uncertainty of sulfadoxine in pork by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Eng*, 2012, 3: 55–58.
- [16] JJG196-2006 常用玻璃量器[S]
- JJG196-2006 Working glass container [S]

(责任编辑: 金延秋)

## 作者简介



张岩岩, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。  
E-mail: 475829091@qq.com